

55

L4 ANSWER 3 OF 8 CAPLUS COPYRIGHT 2004 ACS on STN
AN 1984:139633 CAPLUS
DN 100:139633
TI Pentadecapeptide
PA Agency of Industrial Sciences and Technology, Japan
SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 6 pp.
CODEN: JKXXAF
DT Patent
LA Japanese
FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 58183656	A2	19831026	JP 1982-66080	19820420
	JP 60002320	B4	19850121		
PRAI	JP 1982-66080		19820420		

AB H-Tyr-Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-OH, useful for the radioimmunoassay of somatostatin 28, was prepared by treatment of BOC-Tyr(Br-Z)-Ser(Bzl)-Ala-Asn-Ser(Bzl)-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg(Tos)-Glu(Bzl)-Arg(Tos)-Lys(Cl-Z)-resin (I) (BOC = Me3CO2C, Br-Z =

o-BrC6H4CH2O2C, Bzl = PhCH2, Tos = tosyl, Cl-Z = o-ClC6H4CH2O2C) with anisole/HF followed by chromatog. I was prepared by sequential coupling of protected amino acid using an automatic peptide synthesizer.

RN 89434-86-6P
RN 86670-14-6P
RN 75037-27-3

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁 (JP)
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭58—183656

⑤ Int. Cl.³
C 07 C 103/52
G 01 N 33/56

識別記号
1 0 5

庁内整理番号
7375—4H
7906—2G

⑬ 公開 昭和58年(1983)10月26日

発明の数 1
審査請求 有

(全 6 頁)

⑭ 新規ペントデカペプチド

茨城県新治郡桜村並木3丁目55
8

⑯ 特 願 昭57—66080

⑰ 発 明 者 津田圭四郎

⑱ 出 願 昭57(1982)4月20日

茨城県新治郡桜村吾妻3丁目94
1

⑲ 発 明 者 大審信一

⑲ 発 明 者 澤野真二

茨城県新治郡桜村吾妻4丁目10
4—302

東京都杉並区荻窪1丁目7番10
号

⑲ 発 明 者 国分友邦

⑲ 出 願 人 工業技術院長

茨城県筑波郡谷田部町松代4丁
目420—104

⑲ 指定代理人 工業技術院繊維高分子材料研究
所長

⑲ 発 明 者 白木勝

明 細 書

1. 発明の名称 新規ペントデカペプチド

2. 特許請求の範囲

1 L—チロシル—L—セリル—L—アラニル—
L—アスパラギル—L—セリル—L—アスパラギ
ル—L—プロリル—L—アラニル—L—メチオニ
ル—L—アラニル—L—プロリル—L—アスパ
ラギル—L—グルタミル—L—アルギニル—L—リ
ジン。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、新規なペントデカペプチドに関するものである。さらに詳しくいえば、本発明は、ソマトスタチン28のラジオイムノアッセイに有用なペントデカペプチドに関するものである。

ソマトスタチン14は、ひつじの視床下部から抽出されるテトラデカペプチドで、成長ホルモン、インシュリン、グルカゴン、ガストリン、セクレチン、甲状腺刺激ホルモンなどの分泌を抑制する

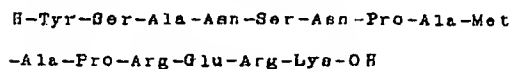
因子として知られている。また、ソマトスタチン28は、ソマトスタチン14のN端にさらに14個のアミノ酸単位が結合したポリペプチドで、ソマトスタチン14よりも高い活性を示す因子で、ソマトスタチン14とは異なる作用を呈するものであることから、生体中でのこの濃度測定は非常に重要な意味を有している。

しかしながら、ソマトスタチン28については、専用の測定法がなく、ソマトスタチン14を測定するためのラジオイムノアッセイ法を代用しているのが実情であるが、これには測定に先立つて、ゲル濾過法などのはん雑な手段でソマトスタチン14と分離しておくことが必要になり、その実用化は非常に困難であつた。

本発明者らは、このソマトスタチン28を直接的に測定する技術を開発すべく鋭意研究を重ねた結果、ソマトスタチン28の側鎖の末端部分に相当するテトラデカペプチドのN⁶位にヨウ素による標識可能なL—チロシル基を導入した化合物を標識抗原とすることにより、ソマトスタチン28

のラジオイムノアッセイが可能になることを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至つた。

すなわち、本発明は、次の式で表わされる新規なペンタデカペプチドを提供するものである。



ただし、式中の各記号は以下のアミノ酸単位を意味する。

Ala; L-アラニン, Arg; L-アルギニン,
Asn; L-アスパラギン, Glu; L-グルタミン酸,
Lys; L-リジン, Met; L-メチオニン,
Pro; L-プロリン, Ser; L-セリン,
Tyr; L-チロシン。

本発明のペンタデカペプチドは、ペプチド合成の際に用いられる常法に従い、アミノ基の保護された α -アミノ酸とカルボキシル基の保護された α -アミノ酸とを上記の構造の順序に順次ペプチド結合させることにより製造することができる。この際のペプチド形成は、活性エステル化法、混合酸無水物法、活性アミノ化法、縮合剤を用いる

方法など公知の方法の中から適当に選択して行うことができるが、特に有利なのは合成樹脂をベースとした固相合成法である。この方法によると、先ず反応性基をもつ合成樹脂例えばクロルメチルポリスチレン樹脂にアミノ基を保護したL-リジンの活性誘導体を反応させて、L-リジン基の結合した合成樹脂を製造し、次いでL-リジン基の α 位のアミノ基の保護基を脱離し、これにアミノ基を保護したL-アルギニン酸を反応させたのち、そのアミノ基の保護基を脱離するという操作を繰り返して、15個の α -アミノ酸を結合させ、所望のペンタデカペプチドを得ることができる。

このようにして得られた本発明のペンタデカペプチドは、末端のL-チロシン基中のヨウ素を放射性元素で標識し、ソマトスタチン28のラジオイムノアッセイ用標識化合物として供することができる。

次に実施例によつて、本発明をさらに詳細に説明する。実施例中に示されている略号は以下の意味をもつ。

- 3 -

SS; ソマトスタチン
Ala; L-アラニン単位
Arg; L-アルギニン単位
Asn; L-アスパラギン単位
Glu; L-グルタミン酸単位
Lys; L-リジン単位
Met; L-メチオニン単位
Pro; L-プロリン単位
Ser; L-セリン単位
Tyr; L-チロシン単位
DCO; ジシクロヘキシルカルボジイミド
TEA; トリエチルアミン
TFA; トリフルオロ酢酸
DMF; ジメチルホルムアミド
Boc; t-ブトキシカルボニル基
Br-Z; o-ブロモベンジルオキシカルボニル基
Cl-Z; o-クロロベンジルオキシカルボニル基
Bzl; ベンジル基
MB; p-メチルベンジル基
Tos; トシル基

- 4 -

ONp; p-ニトロフェニルエステル基

実施例

(A) Boc-Lys(Cl-Z)-樹脂の製造

Boc-Lys(Cl-Z)-OH のt-ブチルアミン塩4.88gを酢酸エチル中に分散させ、1Mクエン酸水溶液、水をふつて脱塩し、無水硫酸ナトリウムで乾燥したのち、酢酸エチルを除去した。

残つたオイルを15mlのメタノールに溶かし、トリメチルベンジルアンモニウムヒドロキッドメタノール溶液(40%)4mlを加えた。完全に混合したのちこれをロータリーエバポレーターにかけ、メタノールを除去した。残つた塩にジオキサンを加え、エバポレーターで乾固した。この操作をさらに、ジオキサン、メタノールについて1回ずつ繰り返したのち、残つた塩を十分真空乾燥した。この塩を60mlのDMFにとかし、クロルメチル化ポリスチレン樹脂(架橋度1%)5gを加え、終夜かきまぜた。ガラスフィルター上に樹脂を集め、DMF、メタノール、水、メタノール、ジクロルメタンの順に洗い、真空乾燥して、Boc-

Lys(Cl-Z)-樹脂 5.5 g を得た。この樹脂の Lys 含量は、樹脂 1 g あたり 0.27 ミリモルであった。

(B) Boc-Tyr(Br-Z)-Ser(Bzl)-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg(Tos)-Glu(Bzl)-Arg(Tos)-Lys(Cl-Z)-樹脂の製造

合成は固相合成法により、ペプチド自動合成装置を用いて行つた。α-アミノ基の保護基には Boc を使い、アミノ酸側鎖の保護には次のようなものを用いた。Glu, Ser, Bzl; Arg, Tos; Lys, Cl-Z; Tyr, Br-Z。各アミノ酸の縮合は第 1 表に示した工程に従つて行つた。アミノ酸誘導体及び DCC は、樹脂についた Lys の 2.5 倍当量用い、それぞれ 2 回ずつ縮合を繰り返した。Asn の導入には活性エステル法を用い、第 2 表の工程に従つて行つた。Boc-Asn-ONp は Lys に対して 8 倍当量を用いた。全縮合工程を終つたのち、樹脂をガラスフィルター上に集め、DMF、メタノール、ジクロロメタン、メタノールの順に洗い、真空乾燥し

- 7 -

た。この方法により、Boc-Lys(Cl-Z)樹脂 2.8 g から 4.59 g の保護ペプチド樹脂が得られた。

第 1 表

	工 程	時 間 (分)	繰返し 回 数
1	ジクロロメタン, 洗浄	2	2
2	50%TFA(ジクロロメタン溶液), 脱保護	30	1
3	ジクロロメタン, 洗浄	2	3
4	クロロホルム, 洗浄	2	3
5	10%TEA(クロロホルム溶液), 中和	2	1
6	" "	5	1
7	クロロホルム, 洗浄	2	3
8	ジクロロメタン, 洗浄	2	3
9	Boc-アミノ酸	5	
10	DCC, 縮合	60	
11	ジクロロメタン, 洗浄	2	3
12	Boc-アミノ酸	5	
13	DCC	300	
14	ジクロロメタン, 洗浄	2	1
15	メタノール, 洗浄	2	1
16	ジクロロメタン, 洗浄	2	1
17	メタノール, 洗浄	2	1
18	ジクロロメタン, 洗浄	2	1

- 8 -

(C) H-Tyr-Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-OH の製造

Boc-Tyr(Br-Z)-Ser(Bzl)-Ala-Asn-Ser-(Bzl)-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg(Tos)-Glu(Bzl)-Arg(Tos)-Lys(Cl-Z)-樹脂 4.50 g に、アニソール 6 ml を加えて 1 晩放置したのち、反応容器をドライアイス-エタノールで冷しながら HF 50 ml を加え、0℃で 1 時間反応させた。減圧下でフッ化水素及びアニソールを除き、残留物を酢酸エチルで十分洗つた。これを 2 M 酢酸で抽出し、ガラスフィルターで樹脂を除去した。こうして得られた粗ペプチドの酢酸水溶液を弱塩基性イオン交換樹脂を通したのち、凍結乾燥して、粗ペプチドを得た。粗ペプチドはセフアデックス G-25 によるゲル濾過(溶出液: 2 M 酢酸)、カルボキシメタルセルロースによるイオン交換クロマト(溶出液: 0.05 M~0.5 M 酢酸アンモニウム)、逆相系分取用高速液体クロマト(溶出液: 0.05 M 酢酸アンモニウム、9%アセトニトリル)で精

第 2 表

	工 程	時間(分)	繰返し回数
1~7	第 1 表と同じ	2	3
8	DMF, 洗浄	999	
9	Boc-アミノ酸P-ニトロフェニルエステル, 縮合		
10	DMF	2	1
11	ジクロロメタン, 洗浄	2	1
12	メタノール, 洗浄	2	1
13	ジクロロメタン, 洗浄	2	1
14	メタノール, 洗浄	2	1
15	ジクロロメタン, 洗浄	2	1

- 9 -

- 399 -

- 10 -

製し、高純度の H-Tyr-Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-OH 460 μ gを得た。

HPLCによる分析

条件：カラム：日立ゲル3053(4 \times 150mm)

溶出液：0.2 M トリエチルアンモニウム
ホスフェート、6% アセトニ
リル

検出：UV 220nm

溶出位置：7.3分(このクロマトグラムを第1図
に示す。)

6NHClによる加水分解(22時間、43時間)後
のアミノ酸組成

Tyr:0.98(1), Ser:1.97(2), Ala:2.97(3),
Asp:2.00(2), Pro:2.13(2), Met:0.94(1),
Arg:2.13(2), Glu:1.04(1), Lys:0.99(1)

カッコ内の値は理論値

参考例

次に本発明のペンタデカペプチドを用いてBB-
28のラジオイムノアッセイを行った例を示す。

-11-

12に現れ、その比放射能は、20~30 μ Ci/ μ g
であった。

(B) 抗BB-28血清の調製

BS-28をグルタルアルデヒドを用いてウシ
血清アルブミン(以下BSAと略記する)と複合
させ、この一定量を生理食塩水1mlに溶解し、こ
れに等量のフロイント助剤(Freund's adjuvant)
を加えて乳化させたものを、4羽の家兎に1羽当
り数10か所の皮内に注射し、これを2週間ごと
に4~5回反覆した。4羽の家兎のうち1羽につ
いて特異的な抗体R561を得た。

(C) 標準液の調製

合成により製造したBS-28を緩衝液に溶解
し、その1ml中にそれぞれ31.25 μ g, 62.5 μ g,
125 μ g, 250 μ g, 500 μ g, 1ng, 2ng, 4ng及び
8ngのBS-28を含む標準液を調製した。

また、本発明化合物の特異性を検べるために、
同様にして緩衝液1ml中にそれぞれ1ng, 10ng,
100ng, 1 μ g及び10 μ gのBS-14を含む標準
液を調製した。

-13-

(A) 標識抗原の調製

本発明のペンタデカペプチドを以下のようにし
てNa¹²⁵Iにより標識する。

反応試験管に pH 5.0 の 0.05 M 酢酸アンモニ
ウム緩衝液 10 μ L、ペンタデカペプチド 5 μ g を
含む pH 5.0 の 0.05 M 酢酸アンモニウム緩衝液
5 μ L、Na¹²⁵I 0.3~0.5 μ Ci、乳酸過酸化酵素
(100ng/ μ L) 3 μ L、過酸化水素(102ng/ μ L)
2 μ L を順次装入し、2 分間放置後再度同濃度の
過酸化水素 3 μ L を加え、さらに 3 分間放置した
のち、pH 4.6 の氷冷した 0.05 M 酢酸アンモニ
ウム緩衝液 0.5 ml を加えて反応を停止させた。次
いでこの反応混合物をカルボキシメチルセルロー
スのカラムクロマトグラフィー(0.6 \times 12cm)
に通し、pH 4.6 の 0.05~0.5 M 酢酸アンモニウム
緩衝液により溶離し、直線濃度勾配下で 2 ml ずつ
の分画を集め、¹²⁵I で標識されたペンタデカペプ
チドを得た。各分画の放射活性を測定すると、分画
2 に遊離ヨウ素の放射活性が認められ、また、抗
原性を有するペンタデカペプチドのピークは分画

-12-

この際の緩衝液としては、0.1% セラチン水溶
液と 0.2% BSA 水溶液と 0.025 M EDTA 水溶液
と 0.15 M NaCl 水溶液と 0.01 M H₂PO₄ 水溶液
との混合物であつて、pH 7.5 のもの(以下
GBPBS と略記する)を使用した。このものは、
標識抗原、抗血清、BB-28 の調製や希釈など
にも用いられた。

(D) BB-28 のラジオイムノアッセイ

ガラス試験管(0.8 \times 9cm)に、GBPBS 0.2
ml、合成BS-28の標準液 0.1 ml、抗血清 R
561(500倍希釈) 0.1 ml、(A)で得た標識抗原
0.1 ml(約5000cpm)を順次装入し、4℃で
48時間インキュベートし、デキストラン被覆炭
を用いてB/Pを分離した。標識抗原とR561抗体
との結合能、すなわち抗体の力価を求め、B/T
(総放射線量) \times 1000 μ gで表わした。

次に抗血清R561を1000倍、2000倍、4000
倍及び8000倍に希釈したものについて、同様に
して力価を求め、その結果を第2図に示す。

他方、本発明化合物の合成標準BS-28に對

-14-

する最少検出下限値は 6.25 pg / 反応チューブで、その標準曲線は第 3 図に実線として示すとおりであつた。

また、本発明化合物を標識抗原として用いた場合の交差性の特異性を示すために、88-14 に対する標準曲線を求めたところ、第 3 図の破線に示すとおりで、全く交差性は認められなかつた。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明化合物のクロマトグラム、第 2 図は、本発明化合物を標識抗原としたときの、抗血清 R 561 についての希釈曲線、第 3 図は本発明化合物の合成標準 88-28 及び 88-14 に対する標準曲線である。

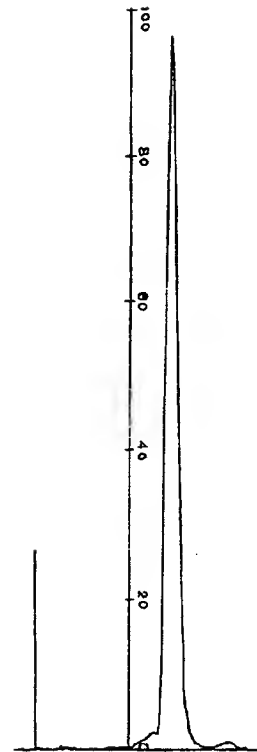
特許出願人 工業技術院長 石 坂 誠 一

指定代理人 工業技術院繊維高分子材料研究所長

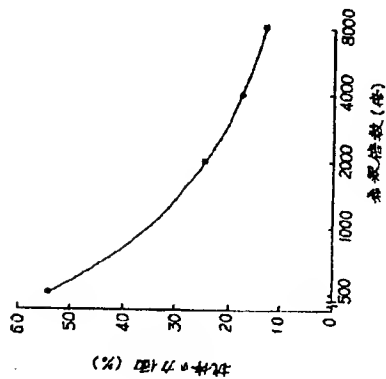
岡 太



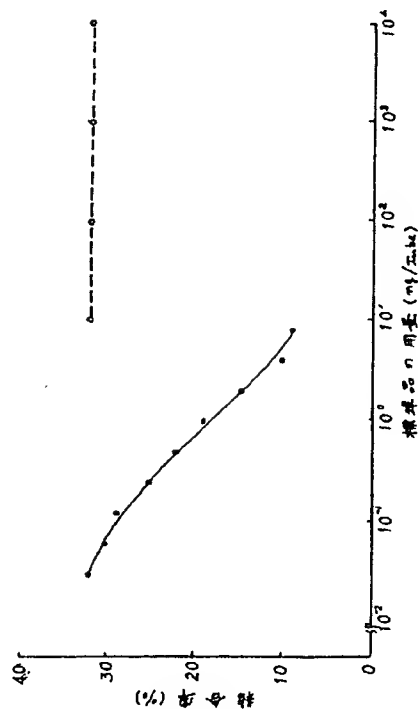
第 1 図



第 2 図



第 3 図



官 庁 手 続
手 続 補 正 書

昭和58年 2 月 4 日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿



1. 事件の表示

昭和57年 特許願 第66080号

2. 発明の名称

新規ペンタデカペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(114)工業技術院長 石 坂 誠 一

4. 指定代理人

茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番4号

(0036)工業技術院繊維高分子材料研究所

岡 太



5. 補正命令の日付

自 発

6. 補正により増加する発明の数 0

7. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄
及び発明の詳細な説明の欄



特許請求の範囲

1. L-チロシル-L-セリル-L-アラニル-
L-アスパラギル-L-セリル-L-アスパラギ
ル-L-プロリル-L-アラニル-L-メチオニ
ル-L-アラニル-L-プロリル-L-アルギニ
ル-L-グルタミル-L-アルギニル-L-リジ
ン。

8. 補正の内容

- (1) 特許請求の範囲を別紙のとおり訂正します。
- (2) 明細書第3ページ第10行の「dlw」を「dlu」に訂正します。
- (3) 同第4ページ第9行の「L-アルギニン酸」を「L-アルギニン」に訂正します。
- (4) 同第4ページ第14～18行の「L-チロシル基中のロウ基を放射性元素」を「L-チロシル基を放射性ロウ基」に訂正します。
- (5) 同第6ページ第6行の「水とふつて」を「水とふつて」に訂正します。
- (6) 同第9ページ第2表第6行の「ジクロルメタン」を「ジクロルメタン」に訂正します。

- 2 -